

用单分子技术研究 Sso7d 与 DNA 的相互作用

滕翠娟 陆越 马建兵 李明 陆颖 徐春华

Interaction between Sso7d and DNA studied by single-molecule technique

Teng Cui-Juan Lu Yue Ma Jian-Bing Li Ming Lu Ying Xu Chun-Hua

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 67, 148201 (2018) DOI: 10.7498/aps.67.20180630

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20180630>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2018/V67/I14>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于片层光照明的新型单分子横向磁镊

Single molecule transverse magnetic tweezers based on light sheet illumination

物理学报.2018, 67(14): 148702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.148702>

tBid 蛋白引发磷脂膜透化过程的研究

Fluorescent investigation on process of tBid inducing membrane permeabilization

物理学报.2018, 67(14): 148703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.148703>

磁镊结合 DNA 发夹的方法在 RecA 蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination

物理学报.2016, 65(21): 218702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.218702>

软物质实验方法前沿: 单分子操控技术

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation

物理学报.2016, 65(18): 188706 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188706>

全内反射瞬逝场照明高精度磁镊及其在 DNA 解旋酶研究中的应用

A pair of high resolution magnetic tweezers with illumination of total reflection evanescent field and its application in the study of DNA helicases

物理学报.2013, 62(16): 168703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.168703>

用单分子技术研究Sso7d与DNA的相互作用*

滕翠娟¹⁾²⁾ 陆越¹⁾²⁾ 马建兵¹⁾²⁾ 李明¹⁾²⁾ 陆颖¹⁾ 徐春华^{1)†}

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家研究中心, 软物质物理重点实验室, 北京 100190)

2) (中国科学院大学物理科学学院, 北京 100049)

(2018年4月9日收到; 2018年4月21日收到修改稿)

为了维持基因的稳定性, 每种生物体都含有一套独特的染色质蛋白来保护脱氧核糖核酸(DNA)的结构, 观察染色质蛋白对DNA结构的作用过程和结果, 可以帮助人们了解这些蛋白的具体功能和作用机理. 硫化叶菌是一种能在高温下存活的古细菌, Sso7d是硫化叶菌的一种染色质蛋白. 深入地了解Sso7d和DNA链的相互作用, 有助于解释硫化叶菌的DNA为何能在高温环境下保持活性, 本文通过原子力显微镜(AFM)和磁镊两种单分子操作手段, 研究了Sso7d与DNA的相互作用. AFM的实验结果给出了Sso7d与DNA的作用过程: 结合Sso7d后, DNA首先发生弯折, 然后出现loop结构, 最终DNA会团聚为致密的核结构. 利用磁镊装置测量了Sso7d的结合对打开DNA双链的影响, 实验结果表明Sso7d的结合导致打开DNA双链的力的增大, 经过数据分析, 计算出Sso7d与DNA结合的结合能 $\Delta G = 3.1k_B T$, 平均每5.5个碱基对(bp)结合一个Sso7d, 较高的结合密度和较大的结合能, 两方面的作用结果, 解释了Sso7d能够稳定DNA结构的原因.

关键词: Sso7d, 染色质蛋白, 原子力显微镜, 磁镊

PACS: 82.37.Np, 87.15.Kj, 87.80.Nj, 87.15.H-

DOI: 10.7498/aps.67.20180630

1 引言

在生物体内, 脱氧核糖核酸(DNA)的解旋、转录和复制等一切活动都是在各种相关蛋白质的调控下进行的. 其中染色质蛋白在一切生物体内都是必不可少的, 其在基因的结构和功能的调节中具有重要作用, 尤其是能够有效地折叠DNA, 保证基因结构的稳定^[1]. 根据16S核糖体核糖核酸(RNA)的不同, 将生物分为三个域^[2], 分别为细菌(bacteria)、真核生物(eukarya)和古细菌(archaea). 在真核生物中, DNA在组蛋白(histone)的作用下缠绕成DNA的基本结构单元——核小体^[3]. 在原核生物体内, 存在很多DNA结合蛋白, 如HU, IHF, H-NS, Fis和Lrp等^[4,5], 在这些蛋白的作用下, 染色质DNA被折叠加工为一个致密的结构, 称之为拟核. 在古细菌中, 染色质蛋白的情况也是相当复杂的^[6]. 古细菌两个最大的门: 广古菌(Euryarchaeota)和泉古菌(Crenarchaeota), 其中的广

古菌, 存在类似histone的染色质蛋白^[7,8]; 而泉古菌中, 没有这种染色质蛋白, 取而代之的是一系列分子量比较小的染色质蛋白, 如Alba, Sul7d, CC1和Cren7等^[9,10]. 其中的Sul7d存在于硫化叶菌目(Sulfolobales)中, 是一系列分子量为7 kDa的染色质蛋白, 本文研究的是其中的Sso7d.

在硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)中, Sso7d是一种大量存在的染色质蛋白, 其占细胞中蛋白质总量的5%^[11], 近年来对Sso7d的研究已逐步深入. Sso7d由63个氨基酸组成^[12], 分子量为7 kDa^[13]. 在溶液中, Sso7d以单体形式结合在双链DNA(dsDNA)上^[12,14], 每个Sso7d分子可以结合4—6个碱基对^[15]. Sso7d的结合可以增加DNA的负超螺旋^[16,17], 并且能够使DNA的熔解温度提高30.6 °C^[18], 其人工突变体能够承受更高的熔解温度和pH值范围^[19]. Sso7d现在经常作为拼接蛋白连接DNA和其他有机分子^[20], 还可以作为支架蛋白把多个蛋白连接为一个功能性的复合体, 并促进其互相作用^[19,21]. 更加深入地掌握Sso7d和

* 国家自然科学基金(批准号: 11574381, 11574382)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: xch@iphy.ac.cn

DNA的作用机理,可以更好地发挥Sso7d在这些系统构建中的功能. Sso7d与小片段DNA (8 bp, bp为碱基对)结合后的复合物的晶体衍射结果显示, Sso7d结合在DNA小沟上,通过嵌入DNA双螺旋使DNA产生60°的弯折^[22,23]. 目前,对于较长片段的DNA与Sso7d的结合状态,有电子显微镜和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)的结果^[12,24],但并没有直观地给出Sso7d与DNA的作用过程. 本文采用AFM研究Sso7d的结合对DNA形态的影响,观察不同浓度Sso7d条件下较长片段DNA与Sso7d结合后的结构图像,分析得出DNA的团聚过程;用单分子磁镊研究Sso7d的结合对打开DNA双链的影响,测定了不同Sso7d浓度下打开DNA双链的力的大小,计算得到了Sso7d和DNA结合的结合能.

2 实验材料与方法

2.1 蛋白质及反应溶液

染色质蛋白Sso7d,由中国科学院微生物研究所的黄力研究员提供,制备方法参考文献^[25, 26]. Sso7d溶于保存溶液中,具体成分为10 mmol/L Hepes (pH值7.6, 25 °C), 0.2%牛血清白蛋白(BSA), 0.1% Tween-20, 25 mmol/L NaCl, -20 °C冰箱保存. 磁镊实验中,反应溶液和Sso7d的保存溶液相同. AFM实验中,为避免BSA对成像的影响,在制作样品过程中所用的DNA与Sso7d反应的溶液中不含有BSA.

2.2 DNA的制备

实验中使用了三种不同的DNA以实现不同的实验目的:一是总长度为3000 bp的直链DNA (DNA1);二是含有1200 bp的直链DNA (DNA2);三是含有发卡(hairpin)结构的总长度为3000 bp的DNA (DNA3). DNA1和DNA2直接由聚合酶链式反应(PCR)制得. DNA3的制备可参考文献^[27], DNA3含有一个hairpin结构和两个dsDNA手柄. 其中, hairpin结构含有120 bp,两个手柄DNA长度分别为2300和700 bp.

2.3 DNA-Sso7d复合物的制备

在反应溶液(10 mmol/L Hepes, pH值7.6, 25 mmol/L NaCl)中,终浓度为0.5 nmol/L的

DNA1分别与终浓度为0.5, 1.0, 3.0 μmol/L的染色质蛋白Sso7d混合均匀,室温下反应5 min,分别得到DNA:Sso7d质量比为18:7, 9:7, 3:7的DNA1-Sso7d反应产物;之后,加入与各产物溶液等体积的戊二醛固定液(10 mmol/L Hepes, pH值7.6, 25 mmol/L NaCl, 0.8%戊二醛),固定20 min;最后,用AFM制片溶液(10 mmol/L Tris-HCl, pH值7.4, 10 mmol/L MgCl₂)稀释上述所得各溶液到合适的浓度,以备滴至云母片制作样品. DNA2-Sso7d复合物的制备方法同上.

2.4 AFM及其样品的制备

实验所用的AFM是Bruker公司的高分辨AFM Multimode 8. 扫描模式为scanasyst, 扫描探针型号为scanasyst-air, 扫描速率为0.977 Hz. 待扫描样品的准备过程为:取12 μL待测已稀释到合适浓度的DNA与Sso7d的反应溶液,滴到干净云母片(1 cm × 1 cm)上,孵育5 min;之后用4 mL的超纯水冲洗云母片以去除盐离子和未吸附到云母片上的DNA-Sso7d复合物;最后,用氮气缓慢吹干云母表面.

2.5 磁镊

实验所用磁镊为实验室搭建的纵向磁镊装置,采样频率为20 Hz. 实验中所用DNA为DNA3. 首先, DNA和顺磁性小球(Invitrogen, Dynabeads M-280, 表面Streptavidin修饰)按1:10的摩尔比混合,室温缓慢旋转混匀5 min;然后,向反应体系中加入磷酸缓冲液稀释至适当浓度,注入磁镊样品槽,孵育5 min;最后,通过向样品槽中缓慢加入磷酸缓冲液,冲去游离的顺磁性小球和未连接的DNA,即完成目标单分子连接的构建.

3 实验结果与讨论

3.1 Sso7d结合导致的DNA链凝聚的作用过程

DNA1分别与不同浓度的Sso7d溶液反应5 min后,用戊二醛固定液固定20 min,然后用AFM制片溶液稀释,得到终溶液,分别滴到云母片上制得待扫描样品. 从AFM图像上可以看出,反应时间设定为5 min时,当Sso7d:DNA的质量比(7:18)比较低时,如图1(a)所示, DNA上

出现很多弯折点, 弯折点处结合了 Sso7d. 随着 Sso7d:DNA 质量比 (7 : 9) 的提高, DNA 在 Sso7d 的作用下, 凝聚出一个比较紧密的小核, 如图 1(b) 所示. 当 Sso7d:DNA 质量比 (7 : 3) 进一步提高, 如图 1(c), 整条 DNA 凝聚为致密的核结构, 此反应条件下, 剩余的自由游离的 DNA 链变得很少.

为了进一步研究 Sso7d 与 DNA 的结合状态是否随时间发生变化, 本文做了另一组对照实验: 其他反应条件同上, 只改变反应时间, 将 Sso7d 和 DNA1 的反应时间设定为 60 min. 图 1(d) 显示 Sso7d:DNA 的质量比为 7 : 18 时, 反应 60 min 后, DNA1-Sso7d 复合物的构象图, 从图中可以看出 DNA 出现 loop 结构. 当 Sso7d:DNA 的质量比为 7 : 9 时, 反应 60 min 后, DNA1-Sso7d 复合物的构象图如图 1(e) 所示, 可以看到更多的 loop 结构, 而且 DNA 进一步团结在小的凝聚核周围. 当 Sso7d 与 DNA 的质量比达到 7 : 3 时, 反应 60 min 后, 如图 1(f) 所示, DNA 完全凝聚为致密的核结构, 无游离的自由 DNA 链. 从实验结果可以看出, 整体而言, 在 Sso7d : DNA 质量比相同的条件下, 和 5 min 反应时间的结果相比, 反应时间延长之后, 在染色质蛋白 Sso7d 的作用下, DNA 变得更加致密.

综合以上结果, 可以看出, DNA 的凝聚成核过程始于 Sso7d 的作用导致的 DNA 的弯折, 随着反

应时间的延长, loop 出现; 之后 DNA 在 Sso7d 的作用下凝聚出一个致密的小核, 其余游离的 DNA 链分布在小核周围, 直至整条 DNA 凝结为较为致密的核结构. 而且, 高浓度的 Sso7d 才能够使 DNA 高度凝聚, 这说明硫化叶菌中 Sso7d 的含量很高^[11]是很有必要的.

Loop 结构的出现是 DNA 的凝聚过程中十分重要的环节. 由于 DNA1-Sso7d 复合物的结构较复杂, 若 DNA 太长则不易看清细节. 因此, 本文选用一条较短的 DNA 链 (DNA2, 1200 bp) 做了 Sso7d 与 DNA 相结合的实验, 其 AFM 图像如图 2 所示, 更加清楚地展示了 DNA loop 的形成过程. 实验中, Sso7d 和 DNA 的质量比为 7 : 18, 反应时间分别设定为 5 min 和 60 min. 反应 5 min 后, DNA 构象如图 2(b) 和图 2(c) 所示, DNA 链出现不同程度的弯折; 反应 60 min 后, DNA 构象如图 2(d) 所示, 弯折更加明显, 并出现 loop 结构. 整个反应过程解释为: Sso7d 结合在 DNA 上, 使 DNA 发生弯折; 又由于 DNA 带负电, Sso7d 带正电, Sso7d 的结合中和了 DNA 的部分电荷, DNA 的静电排斥变弱, DNA 变得更容易弯曲; 弯曲的 DNA 链相互靠近, 结合在 DNA 上的 Sso7d 之间可能发生相互作用导致了 loop 结构的出现, 从而促进 DNA 的进一步凝聚.

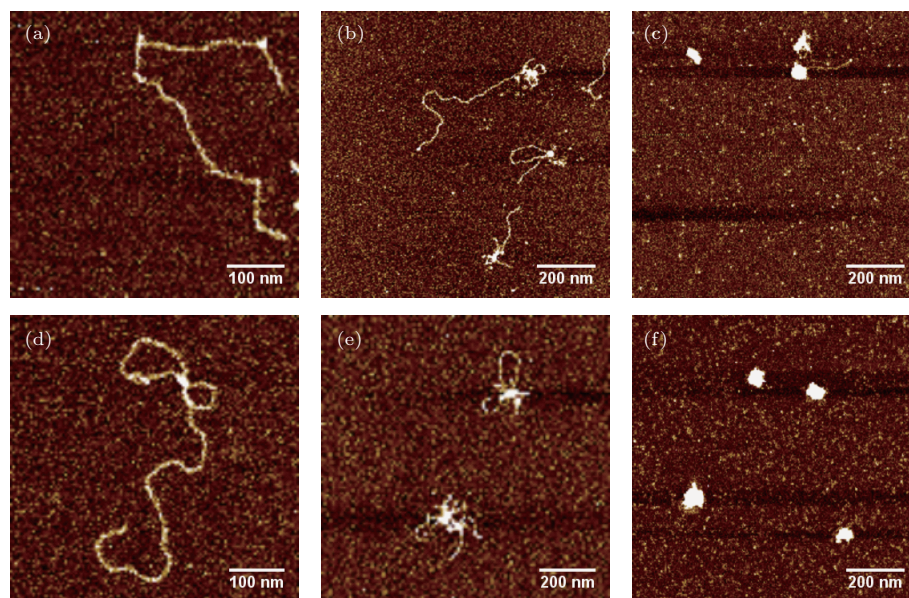


图1 3000 bp DNA1 与不同浓度的 Sso7d 溶液作用后的构象图 (a) 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 5 min; (b) 1 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 5 min; (c) 3 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 5 min; (d) 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 60 min; (e) 1 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 60 min; (f) 3 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 60 min

Fig. 1. Conformations of 3000 bp DNA1 reacted with different Sso7d concentration: (a) 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 5 min; (b) 1 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 5 min; (c) 3 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 5 min; (d) 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 60 min; (e) 1 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 60 min; (f) 3 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d, 60 min.

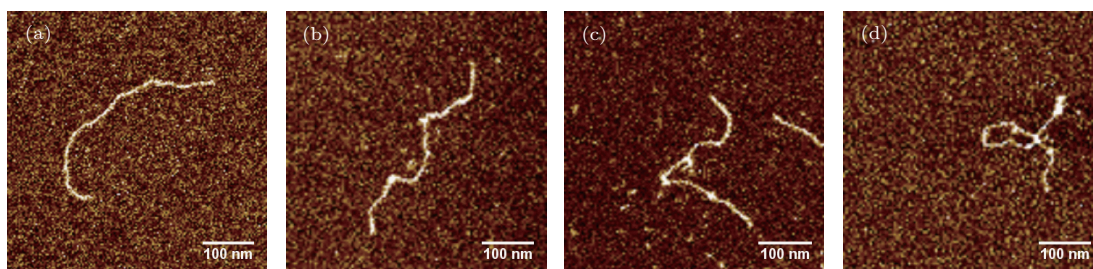


图2 1200 bp 的 DNA2 及其与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Sso7d 溶液作用不同时间后的构象图 (a) 1200 bp DNA2; (b), (c) 5 min; (d) 60 min

Fig. 2. Conformations of 1200 bp DNA2 with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Sso7d reacted at different time: (a) 1200 bp DNA2; (b), (c) 5 min; (d) 60 min.

3.2 Sso7d 使 DNA 弯折的角度测量

在图 1(a) 和图 2(b) 中, DNA 被 Sso7d 结合后发生弯折, 关于 Sso7d 引起的 DNA 的弯折角度的大小, 有相关文献报道. 有核磁共振实验得到了 Sso7d 引起的 DNA 弯折角度为 30° [28], 但是在核磁共振实验中, 溶液环境下 DNA 在结合态和自由态之间的切换很容易导致弯折角度测量结果出现偏差; 另外有文献得到了由 Sso7d 与 DNA 相互作用后的结晶结构, 测得 Sso7d 使 DNA 弯折 60° [22,23],

仍有研究对此表示质疑, 其认为在晶体衍射实验中, Sso7d-DNA 复合物只能被固定为一种趋向于形成晶体结构的构象, 并不能反映其在溶液中的真实状态 [24]. 在 AFM 实验中, Sso7d 和 DNA 在液体环境中相互作用, 之后其复合物构象被戊二醛固定, 因此通过 AFM 图像能够准确地反映其在液体环境中的状态, 更加真实地反映其生理状态. 本文对 AFM 结果中的 DNA 的弯折角度 ϕ 进行了测量统计, 如图 3 所示, 通过高斯拟合, 得到弯折角度值为 58.5° .

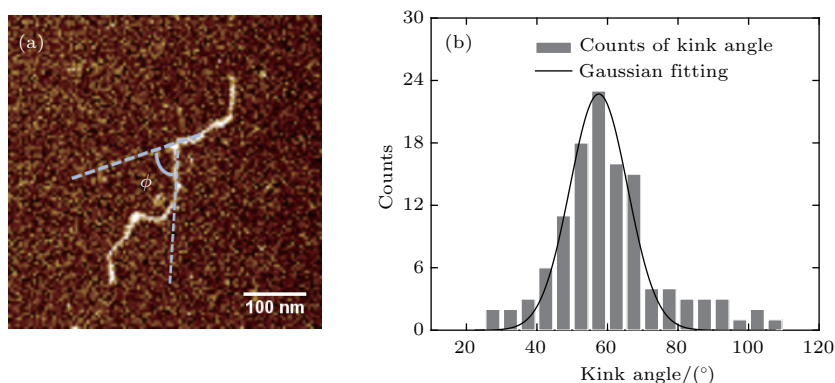


图3 DNA 弯折角度测量 (a) DNA 弯折角度测量示意图; (b) 弯折角度统计分布图和高斯拟合曲线

Fig. 3. Measurement of the DNA kink angle induced: (a) Schematic diagram of DNA kink angle measurement; (b) histogram of the counts of kink angle and Gaussian fitting curve.

3.3 Sso7d 的结合对打开 DNA 双链的影响

硫化叶菌中的 Sso7d 含量极高, 占其细胞内蛋白质总重量的 5% [11], 如此高浓度的 Sso7d, 足以将 DNA 团聚为如图 1(f) 所示的紧致结构, 使 DNA 变得相当稳定. 有 DNA 热熔解实验显示, 在 DNA 溶液中加入一定量的 Sso7d, 可以使 DNA 的溶解温度提高 30.6°C [18]. 可见, 染色质蛋白 Sso7d 可以提

高 dsDNA 的热稳定性. 因此, 本文预测结合染色质蛋白 Sso7d 后, 会提高 DNA 双链的结合能, 此结合能的提高可以直观地表现为打开 DNA 双链所需要的力的变化. 而打开 DNA 双链的力可以通过设计磁镊实验进行测量.

本文所用磁镊装置示意图如图 4(a) 所示, 所用 DNA 底物是 DNA3, 其含有一段 120 bp 的 hairpin 结构. 图 4(b) 举例说明了实验过程中所施加磁力的变化过程以及 DNA 的拉伸曲线.

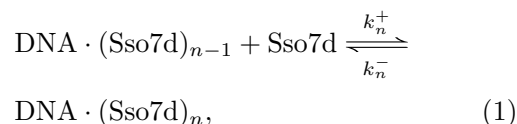
对于所用的 120 bp hairpin DNA, 在本文实验条件下, 不含有染色质蛋白的情况下, 当施加在磁性小球上的拉力增大到约 14 pN 时, hairpin 被完全打开. 随着加入 Sso7d 浓度的提高, 打开 hairpin 所需要的拉力逐渐增大. 如图 4(c) 所示, 当 Sso7d 浓度达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 打开 hairpin 的力的大小为 19 pN 时, 之后再提高 Sso7d 的浓度, 打开 hairpin 的力不再变化.

实验测量了 hairpin 被打开成为单链的长度, 此长度随 Sso7d 浓度的变化而发生变化, 如图 4(d) 所示. 当 Sso7d 的浓度从 0 开始逐渐增大时, hairpin 的打开长度逐渐增大, 其原因是随着 Sso7d 浓度的增大, 打开 hairpin 的力在增大, 碱基之间的距离随力的增大而增大, 从而导致整个 hairpin 打开成单链后的长度增大. 但是, 当 Sso7d 的浓度进一步增大时, hairpin 打开后的长度反而缩小, 此时可能是因为 hairpin 变为单链后仍有 Sso7d 结合在上

边导致其长度缩短.

结合能是表征结合强度的物理参量, 平衡常数能表征化学反应进行的最大程度, 对实验所得的 120 bp 的 hairpin 在不同浓度的 Sso7d 的条件下打开 hairpin 的力进行分析, 可以得到 Sso7d 与 DNA 反应的结合能和平衡常数两个表征量.

Sso7d 以单体的形式结合在 DNA 上, 尚未发现 Sso7d 的结合具有协同效应, 因此假设每个 Sso7d 的结合之间不存在协同作用, 将 Sso7d 与 DNA 的逐个结合反应表示为



k_n^+ 和 k_n^- 分别为正逆化学反应速率常数, 对于确定长度的 hairpin 双链, 假设最多可以结合 N 个 Sso7d. 设定 hairpin 上有一个 Sso7d 结合位点时, $k_1^+ = k^+$, $k_1^- = k^-$. 当 hairpin 上有两个 Sso7d 结合

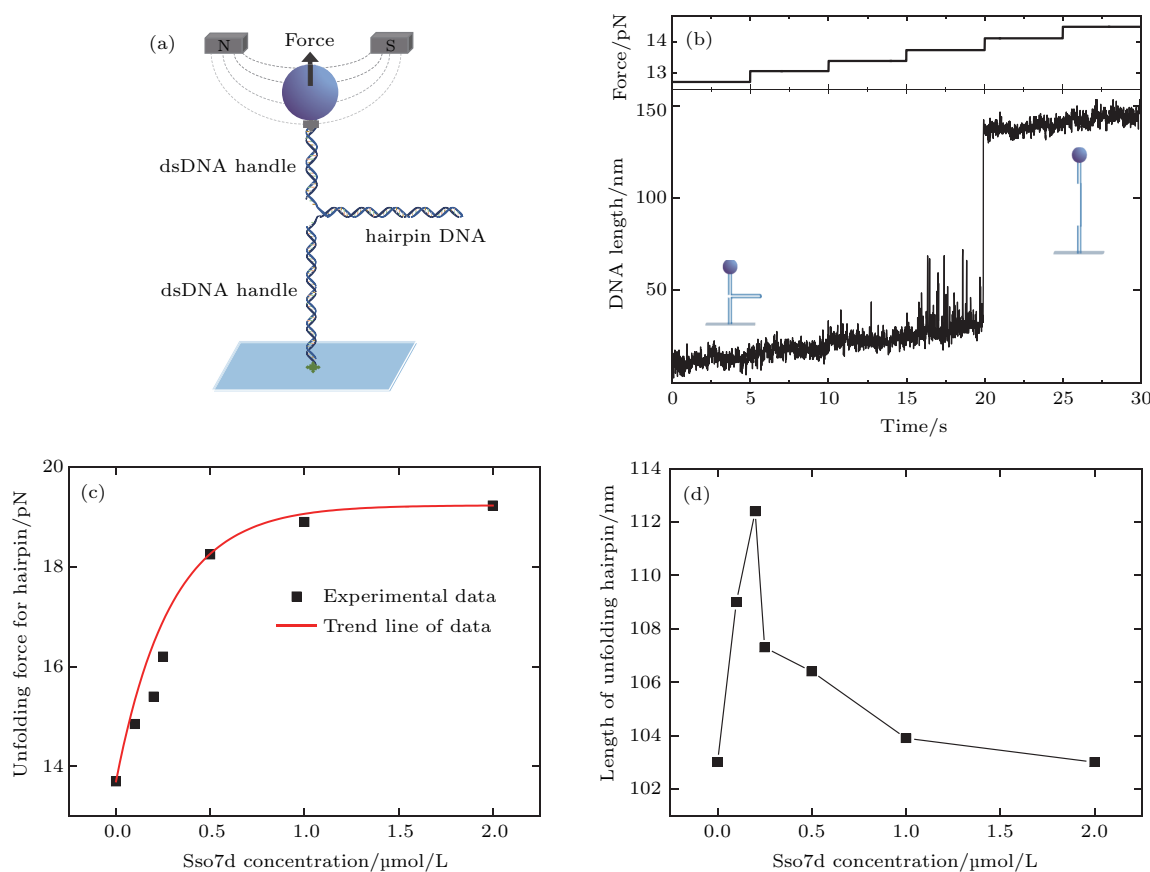


图4 Sso7d对打开 dsDNA 的影响 (a) 实验示意图; (b) hairpin 被打开的实验曲线; (c) 打开 hairpin 的力随 Sso7d 浓度的变化; (d) 不同浓度 Sso7d 条件下, hairpin 被打开为单链的长度

Fig. 4. Influence of Sso7d on dsDNA: (a) Schematic diagram of the experiment; (b) example curves of hairpin unfolding; (c) variation of hairpin unfolding force with Sso7d concentrations; (d) length of unfolded hairpin DNA at different Sso7d concentrations.

位点, 第一个 Sso7d 和 hairpin 结合时, $k_1^+ = 2k^+$, $k_1^- = k^-$; 第二个 Sso7d 结合 DNA 时, 同第一个 Sso7d 和 hairpin 的结合相比, 结合位点减少一个, 解离位点增加一个, 此时结合反应速率常数可以表示为 $k_2^+ = k^+$, 逆反应速率常数, $k_2^- = 2k^-$. 依此类推, 可得

$$k_n^+ = [N - (n - 1)]k^+, \quad k_n^- = nk^-. \quad (2)$$

Sso7d 与 hairpin 的反应体系达到稳态时, 正逆反应速率相等, 反应的每个组分所占的比例不变, 形成动态平衡过程. 从 DNA 与不同浓度 Sso7d 结合后的电泳实验数据^[16,29]以及本文实验数据都可以看出, 对于不同的 Sso7d 浓度, hairpin 上结合的 Sso7d 数量是不一样的, 这个现象可以用达到平衡时各 DNA-Sso7d 复合物之间的浓度比例来描述. 对于反应方程式 (1) 存在如下关系:

$$\frac{[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_{n-1}]}{[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_n]} = \frac{nk^-}{(N - (n - 1))[\text{Sso7d}] \cdot k^+}, \quad (3)$$

$[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_{n-1}]$ 和 $[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_n]$ 分别对应达到动态平衡时结合 $n - 1$ 个 Sso7d 和结合 n 个 Sso7d 的 DNA-Sso7d 复合物浓度. 从 (3) 式中可以发现整个 DNA-Sso7d 复合物体系的浓度变化规律: 对于某个特定的 Sso7d 浓度, 随着 Sso7d 结合个数 n 的增加, 在某个 n 值, 也就是对应着某种特定的 DNA-Sso7d 复合物时, 其平衡浓度所占的比例最大, 在实验中就表现出结合了相应的蛋白数量. 这就是为什么在不同 Sso7d 浓度下, 可以在 hairpin 上观察到不同的 Sso7d 结合数量的原因.

对于结合第 N 个 Sso7d (饱和) 的状况, 存在如下关系:

$$\frac{[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_{N-1}]}{[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_N]} = \frac{Nk^-}{[\text{Sso7d}] \cdot k^+}. \quad (4)$$

随着 Sso7d 浓度的增大, 结合在 hairpin 上的 Sso7d 数量增多, 当 Sso7d 浓度大于某一临界值时, 结合在 DNA 上的 Sso7d 的数量达到饱和, 此时

$$[\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_N] \approx [\text{DNA} \cdot (\text{Sso7d})_{N-1}],$$

$$N = [\text{Sso7d}] \cdot \frac{k^+}{k^-}. \quad (5)$$

从打开 hairpin 的力随 Sso7d 浓度的变化的实验曲线图 4(c) 可以看出, 当 Sso7d 浓度高于 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 打开 hairpin 的力几乎不再增大. 这也就是说, 当 Sso7d 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, Sso7d 的

结合基本达到饱和, 因此, (5) 式成立时 $[\text{Sso7d}] = 1 \mu\text{mol/L}$.

由于 Sso7d 的结合导致打开 hairpin 的力变大, Sso7d 与 DNA 的结合能与打开 hairpin 的能量的变化相等, 根据贝尔公式^[30], 可以得到如下关系:

$$n \cdot \Delta G = \int_{F_0}^F x(F') dF', \quad (6)$$

式中 F_0 为未加入 Sso7d 时打开 hairpin 的力的大小, 在本文实验条件下为 13.7 pN ; F 为加入 Sso7d 后打开 hairpin 的力的大小; $x(F')$ 表示拉力为 F' 时打开 hairpin 所需的反应长度变化; n 为结合在 hairpin 上的 Sso7d 个数; ΔG 为单个 Sso7d 结合的能量.

图 1(e) 和图 2(d) 所用 DNA : Sso7d 质量比相同, 对比两图可知, DNA 越长, 凝聚越明显, 因此推测, 短 DNA 不易凝聚. 由于 hairpin 的长度较短, 故假设 hairpin 没有凝聚, 不考虑除单个 Sso7d 与 hairpin 结合之外的其他能量. 由此可以得出特定 Sso7d 浓度下的结合总能量关系.

由前文分析可知, 当 Sso7d 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, Sso7d 的结合达到饱和, 此后的 hairpin 打开拉力也几乎不变, 大小为 19 pN . 因此可以计算出对于饱和 Sso7d 浓度, $N \cdot \Delta G = 68.1 k_B T$. 将这一结果与前面得到的蛋白浓度和化学反应系数的关系 (5) 式联立, 根据阿伦尼乌斯关系 $K_{\text{eq}} = \frac{k^+}{k^-} = \omega_0 e^{\Delta G / (k_B T)}$, 可以得到

$$N = [\text{Sso7d}] \cdot \omega_0 e^{\Delta G / (k_B T)}, \quad (7)$$

K_{eq} 为化学反应的平衡常数; ω_0 为由尝试频率推导得出的参数, 与化学反应类型有关^[31-33], 此处可以取值为 $10^6 (\text{mol/L})^{-1}$. 利用实验所得的打开 hairpin 的力的值以及结合达到饱和时 Sso7d 的浓度值, 可以计算出一个 Sso7d 与 hairpin 的结合所产生的结合能 $\Delta G = 3.1 k_B T$, 平衡常数 $K_{\text{eq}} = 2.2 \times 10^7 (\text{mol/L})^{-1}$, 还能计算出 120 bp hairpin 可以结合 Sso7d 的个数 $N = 22$, 平均每个 Sso7d 占据 DNA 5.5 个碱基对的位置, 这一结果与 DNA-Sso7d 复合物的结晶结构解析结果相一致^[22], 验证了本文的推导和假设是成立的. 从 Sso7d 与 hairpin 的结合所产生的结合能可以看出, 每一个 Sso7d 的结合能都很可观, 而生物体内大量的 Sso7d 足以将 DNA 完全包被, 每一个 Sso7d 与 DNA 的结合都会引入同等大小的结合能, 这从结合能的角度解释了 Sso7d 为何能够提高 DNA 的熔

解温度以及硫化叶菌如何在高温下维持其基因的稳定.

4 结 论

1) 通过对比不同反应条件下生成的DNA-Sso7d复合物的AFM图像, 看到DNA在Sso7d作用下逐步凝聚的过程: Sso7d和DNA的相互作用, 首先表现为DNA的弯折, 然后会产生loop结构, 以此为基础进一步高度凝聚. 其中loop结构的形成过程也被清晰地观测到.

2) 测量了结合Sso7d后的DNA链的弯折角度, 高斯拟合结果为 58.5° , 与核磁共振成像和晶体衍射成像方法相比, 更加真实地反映了生理状态下Sso7d和DNA的结合状态.

3) 用磁镊方法得到了Sso7d的结合对打开DNA双链的力的影响, 数据分析得到一个Sso7d结合在DNA双链上所产生的结合能 $\Delta G = 3.1k_B T$, 解释了Sso7d能够提高DNA的熔解温度的原因以及硫化叶菌如何在高温下维持基因的稳定.

以上实验结论, 解释了Sso7d对DNA的保护机理, 这给硫化叶菌生活在高温环境下而核酸却能够保持稳定提供了可能的条件. 近年来, Sso7d的突变体经常以脚手架的形式出现在大分子系统中, 深入地研究Sso7d与DNA的相互作用过程, 为精准地设计和构建Sso7d的功能提供了理论基础.

感谢中国科学院微生物研究所黄力研究员提供实验所用蛋白Sso7d.

参考文献

- [1] Luijsterburg M S, White M F, van Driel R, Dame R T 2008 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43** 393
- [2] Woese C R, Fox G E 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 5088
- [3] Grunstein M 1997 *Nature* **389** 349
- [4] Luijsterburg M, Noom M, Wuite G, Dame R 2006 *J. Struct. Biol.* **156** 262
- [5] Dame R T 2005 *Mol. Microbiol.* **56** 858
- [6] Sandman K, Reeve J N 2005 *Curr. Opin. Microbiol.* **8** 656
- [7] Sandman K, Reeve J N 2006 *Curr. Opin. Microbiol.* **9** 520
- [8] Reeve J N, Bailey K A, Li W, Marc F, Sandman K, Soares D J 2004 *Biochem. Soc. Trans.* **32** 227
- [9] Forterre P, Confalonieri F, Knapp S 1999 *Mol. Microbiol.* **32** 669
- [10] Driessen R P C, Dame R T 2011 *Biochem. Soc. Trans.* **39** 116
- [11] Mai V Q, Chen X, Hong R, Huang L 1998 *J. Bacteriol.* **180** 2560
- [12] Choli T, Henning P, Wittmann-Liebold B, Reinhardt R 1988 *Biochim. Biophys. Acta* **950** 193
- [13] Edmondson S P, Shriver J W 2001 *Methods Enzymol.* **334** 129
- [14] White M F, Bell S D 2002 *Trends Genet.* **18** 621
- [15] Lundbäck T, Hansson H, Knapp S, Ladenstein R, Härd T 1998 *J. Mol. Biol.* **276** 775
- [16] Napoli A, Zivanovic Y, Bocs C, Buhler C, Rossi M, Forterre P, Ciaramella M 2002 *Nucleic Acids Res.* **30** 2656
- [17] López-García P, Knapp S, Ladenstein R, Forterre P 1998 *Nucleic Acids Res.* **26** 2322
- [18] Sun F, Huang L 2013 *Nucleic Acids Res.* **41** 8182
- [19] Gera N, Hussain M, Wright R C, Rao B M 2011 *J. Mol. Biol.* **409** 601
- [20] Hernandez Garcia A, Estrich N A, Werten M W T, van der Maarel J R C, LaBean T H, de Wolf F A, Cohen Stuart M A, de Vries R 2017 *ACS Nano* **11** 144
- [21] Gera N, Hill A B, White D P, Carbonell R G, Rao B M 2012 *PLoS One* **7** e48928
- [22] Gao Y G, Su S Y, Robinson H, Padmanabhan S, Lim L, McCrary B S, Edmondson S P, Shriver J W, Wang A H J 1998 *Nat. Struct. Biol.* **5** 782
- [23] Su S, Gao Y G, Robinson H, Liaw Y C, Edmondson S P, Shriver J W, Wang A H J 2000 *J. Mol. Biol.* **303** 395
- [24] Driessen R P C, Meng H, Suresh G, Shahapure R, Lanzani G, Priyakumar U D, White M F, Schiessel H, van Noort J, Dame R T 2013 *Nucleic Acids Res.* **41** 196
- [25] Lou H, Duan Z, Huo X, Huang L 2004 *J. Biol. Chem.* **279** 127
- [26] Guo L, Feng Y, Zhang Z, Yao H, Luo Y, Wang J, Huang L 2008 *Nucleic Acids Res.* **36** 1129
- [27] Li J H, Lin W X, Zhang B, Nong D G, Ju H P, Ma J B, Xu C H, Ye F F, Xi X G, Li M, Lu Y, Dou S X 2016 *Nucleic Acids Res.* **44** 4330
- [28] Agback P, Baumann H, Knapp S, Ladenstein R, Härd T 1998 *Nat. Struct. Biol.* **5** 579
- [29] Guagliardi A, Napoli A, Rossi M, Ciaramella M 1997 *J. Mol. Biol.* **267** 841
- [30] Dudko O K, Hummer G, Szabo A 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 15755
- [31] Pope L H, Bennink M L, van Leijenhofst Groener K A, Nikova D, Greve J, Marko J F 2005 *Biophys. J.* **88** 3572
- [32] Yang W Y, Gruebele M 2003 *Nature* **423** 193
- [33] Woodside M T, Behnke-Parks W M, Larizadeh K, Travers K, Herschlag D, Block S M 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 6190

Interaction between Sso7d and DNA studied by single-molecule technique*

Teng Cui-Juan¹⁾²⁾ Lu Yue¹⁾²⁾ Ma Jian-Bing¹⁾²⁾ Li Ming¹⁾²⁾ Lu Ying¹⁾ Xu Chun-Hua^{1)†}

1) (Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

2) (School of Physical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(Received 9 April 2018; revised manuscript received 21 April 2018)

Abstract

Each organism has its own set of chromatin proteins to protect the stable structure of DNA and thus maintain the stability of genes. Sso7d is a small nonspecific DNA-binding protein from the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus*. This protein has high thermal and acid stability. It stabilizes dsDNA and constrains negative DNA supercoils. Besides, the Sso7d binds in a minor groove of DNA and causes a sharp kink in DNA. By observing the interaction between chromatin protein and DNA structure, we can understand the function and mechanism of chromatin protein. *Sulfolobus solfataricus* can survive at high temperature. To understand why the DNA of *Sulfolobus solfataricus* retains activity at high temperature, we investigate the interaction between Sso7d and DNA by atomic force microscope (AFM) and magnetic tweezers. Atomic force microscope and magnetic tweezers are advanced single molecule experimental tools that can be used to observe the interaction between individual molecules. The experimental result of AFM reveals the process of interaction between Sso7d and DNA. The DNA structure changes at a different concentration of Sso7d and depends on reaction time. At a relatively low concentration of Sso7d, DNA strand forms a kink structure. When the concentration of Sso7d is increased, DNA loops appear. Finally, DNA becomes a dense nuclear structure at a high concentration of Sso7d. If the time of the interaction between Sso7d and DNA is increased, DNA structure tends to be more compact. These results indicate that high concentration of Sso7d is important for the compact structure of DNA. We design an experiment to find out the formation of the looped structure on DNA. Moreover, we measure the angle of kinked DNA and compared it with previous result. Through the experiment of magnetic tweezers, we measure the forces of unfolding the double-stranded DNA complexed with Sso7d at different concentrations. The experimental results show that the binding between Sso7d and DNA increases the force of unfolding the double-stranded DNA. The binding energy between Sso7d and dsDNA is $3.1k_B T$ which is calculated from experimental data. It indicates that DNA base pairs are more stable when chromatin protein Sso7d exists. These results can explain the survival of *Sulfolobus* in high temperature environment.

Keywords: Sso7d, chromatin protein, atomic force microscope, magnetic tweezers

PACS: 82.37.Np, 87.15.Kj, 87.80.Nj, 87.15.H–

DOI: 10.7498/aps.67.20180630

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11574381, 11574382).

† Corresponding author. E-mail: xch@iphy.ac.cn